

【 4 】

氏 名 (本 籍)	宗 寧 (中 国)		
学 位 の 種 類	農 学 博 士		
学 位 記 番 号	博 甲 第 696 号		
学位授与年月日	平成元年 7 月 31 日		
学位授与年月日	平成元年 7 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科		
学 位 論 文 題 目	Studies on α -D-Xylosidase from <i>Bacillus</i> sp. (細菌の生産する α -D-Xylosidase に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	安 井 恒 男
副 査	筑波大学教授	理学博士	新 井 勇 治
副 査	筑波大学助教授	農学博士	日 下 部 功
副 査	筑波大学教授	農学博士	大 庭 喜 八 郎

論 文 の 要 旨

天然に存在する xylose を含むオリゴ糖，多糖はその殆んどが β -xylosyl 結合である事と関連し， β -D-xylanase と β -D-xylosidase については以前よりかなりの研究がなされている。一方 α -xylosyl 結合は tamarind を始めとする植物種子多糖に存在している事が知られているが，詳細な研究例は少なく，このため α -D-xylosidase についての研究は殆んど行われていなかった。

最近になって植物細胞壁の一次構造多糖の構造研究により，一次壁構成成分として，xyloglucan と呼ばれる多糖が広く存在する事が明らかにされた。この xyloglucan の化学構造は基本的には β -(1 \rightarrow 4)-D-glucan を主鎖とし，その大部分の glucose 残基の 6 位の OH に， α -D-xylopyranose 残基が結合している構造を持つ一種の cellulose 天然誘導体とみなされている。

また，植物の病害抵抗性についての研究を通じて，生理活性をもつ xyloglucan 由来のオリゴ糖も発見されている。

以上のような α 結合 xylose の普通的存在と α 結合 xylose を含む生理活性オリゴ糖の発見とあいまって，1985年に α -D-xylosidase の研究が始められ，東北大学の松田和雄教授らの研究グループによって始めて微生物 (*Aspergillus niger*) の生産する α -D-xylosidase の生産，精製及びその性質についての報告が出された。

この α -D-xylosidase は α -xylosyl 残基を含む多糖，オリゴ糖の構造解析に，あるいは生理活性を持つオリゴ糖の調整に利用できるものと考えられる。

この論文は α -D-xyloside 結合を含む基質の調製から， α -D-xylosidase を生産する微生物の検索，分離菌の菌学的研究，酵素生産条件の検討，酵素の精製，その酵素の蛋白化学的・酵素化学

的性質の検討を含む一連の研究に関するものである。

第一章では α -D-xyloside 結合を持つ基質の調製について述べられている。Inducer として使用した methyl 及び isopropyl α -D-xyloside は化学的に合成され、また α 結合の xylobiose は xylose の酸逆重合反応により合成し、炭末カラム、硼酸塩-炭末カラム、調製用 HPLC 及びシリカゲルクロマトグラフィーを含む一連のクロマトグラフィーにより 3 種 (α -1.2, α -1.3, 及び α -1.4) の α -xylobiose を分離、精製した。他方, tamarind 種子多糖 (xyloglucan) の酵素による部分水解により, α -(1 \rightarrow 6)-xyloside 結合を含むオリゴ糖の調製を行った。部分水解物の一連のクロマトグラフィーにより, 3 種類のヘテロオリゴ糖 (D. P. 2 \sim 4), 即ち 0- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glucopyranose (TXG-2), 0- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-0- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose (TXG-3), 及び 0- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-0- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[0- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-D-glucopyranose (TXG-4) が得られた。

第 2 章では α -D-xylosidase 生産菌の検索, 分離された細菌の菌学的研究及び酵素の生産至適条件の検討等が述べられている。グルコースオキシダーゼを利用した新しい検索法を考案し, 自然界よりスクリーニングを行い, α -D-xylosidase を生産する *Bacillus* 属細菌 2 菌株を得た。両菌株とも通性嫌気性, グラム陰性中温性であり, 孢子形成能を持っていた。菌株 No208-918-1 の GC 含量は 50.8mol% であり, No693-1 の GC 含量は 44.5mol% であった。両菌株とも既知の *Bacillus* 種とは性質を異にしており, 新種と推定された。このうち No693-1 株を α -D-xylosidase 生産菌として取上げ, 酵素生産条件について検討した。この酵素は methyl α -D-xyloside 等により誘導される誘導酵素で, glucose 1.0%, peptone 1.0%, methyl α -D-xyloside 1.0%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2% 等を含む培地で振とう培養する事によりよく生産された。

第 3 章では酵素の精製について述べられている。硫酸分画, DEAE-Toyo pearl 650 カラムクロマトグラフィー, その再クロマトグラフィー及びハイドロオキシアパタイトカラムクロマトグラフィー等を行い精製した。精製された標品は Disc 電気泳動及び SDS-Disc-電気泳動で均一であった。

第 4 章では精製酵素の物理化学的及び酵素化学的性質の検討結果が述べられている。本酵素は SDS-Disc gel 電気泳動で subunit の分子量は 82,000, Toyo pearl HW-60 を用いた gel 濾過の結果算出された分子量は 400,000 であった。等電点は 4.3, 酵素活性は 45 $^{\circ}\text{C}$ に至適温度が認められ, 0 \sim 50 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間は安定であった。至適 pH は 7.5 であり, pH 5.0 \sim 9.0 で安定であった。酵素活性は Zn^{2+} , Cu^{2+} , 及び Hg^{2+} イオンにより強く阻害され *p*-CMB 及びモノヨード酢酸でも強く阻害された。この事から本酵素は SH 酵素と推定された。*Asp. niger* 起源の α -D-xylosidase と比較し, *Asp. niger* の酵素より, 阻害剤および金属の影響を受けやすい事が明らかとなった。基質特異性については, 本酵素は α -D-xylopyranosyl 結合に特異的で *p*-nitrophenyl α -D-xylopyranoside, methyl α -D-xylopyranoside 等を分解したが, α -D-xyloside 以外の glycosides に対する活性は全く検出されなかった。Xylobiose 間の分解速度の比較では α -1.4 $>$ α -1.2 $>$ α -1.3 の順で分解した。Tamarind 種子多糖由来の isoprimeverose (TXG-2), 6 2 - α -xylosyl cellobiose (TXG-3) 及び 6 1 -

α -xylosyl 6²- α -xylosyl cellobiose (TXG-4) については TXG-2 > TXG-3 > TXG-4 の速度の順で分解し, xylose の遊離が見られた。*p*-nitrophenyl xyloside 及び isoprimeverose に対する K_m 値は 1.0mM 及び 55.6mM, V_{max} は $0.15 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg-protein}$ 及び $2.22 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg-protein}$ であった。また加水分解により生成する xylose のアノマー型は α であった。Tamarind 種子多糖由来の低分子可溶性画分に作用し xylose を遊離したが, その高分子可溶性画分には全く作用しなかったことから, この酵素は低分子基質に作用しやすい傾向があると推定された。

第 5 章では糖転移作用について述べられている。本酵素は 0.7% isoprimeverose を用いた時には完全に xylose と glucose とに分解したが, 5% 基質濃度の場合には, 糖転移反応が認められた。生成した主な転移反応物を炭末クロマトグラフィーで分離し, 更にシリカゲルクロマトグラフィーで精製する事によって TLC で単一の標品が得られた。得られた標品について構成糖分析, 平均重合度及び旋光度の測定, メチル化分析等を行うことによりその構造を $0-\alpha-D\text{-Xylopyranosyl-}(1\rightarrow4)-0-\alpha-D\text{-xylopyranosyl-}(1\rightarrow6)-D\text{-glucopyranose}$ と同定した。

審 査 の 要 旨

これまで $\alpha-D\text{-xylosidase}$ の研究は殆んど行われておらず, 細菌の $\alpha\text{-xylosidase}$ については全く新しい事実であり, 本論文の内容は酵素化学的に見て重要と思われる。申請者は基質の $\alpha\text{-xyloside}$ を合成しているが, この中には純粋な状態で始めて単離されたものも含まれている。また新しい $\alpha\text{-xylosidase}$ 生産菌のスクリーニング法を考案し, その方法を用いて自然界より $\alpha\text{-xylosidase}$ 生産性細菌を分離するなど独創性がある。申請者は基質の調製から始め, 酵素生産菌の分離を行い, 該菌の菌学的性質の研究, 更に酵素生産条件の検討をなし, 生産された酵素を精製してその蛋白化学的・酵素化学的研究を行うなど, 一連の酵素化学研究法を習得しており, 今後酵素化学の研究者として十分やってゆけるものと考えられる。申請者も述べている如く, 応用面として本酵素は糖類の構造研究の手段として利用する事ができ, また生理活性オリゴ糖の調製にも活用されるものと期待される。

よって, 著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。